

University of Groningen

## Developmental and pathological roles of BMP/follistatin-like 1 in the lung

Tania, Navessa

**IMPORTANT NOTE:** You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

*Document Version*

Publisher's PDF, also known as Version of record

*Publication date:*

2017

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

*Citation for published version (APA):*

Tania, N. (2017). *Developmental and pathological roles of BMP/follistatin-like 1 in the lung*. [Thesis fully internal (DIV), University of Groningen]. University of Groningen.

### Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

### Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

# CHAPTER 10

INDONESIAN SUMMARY/  
RANGKUMAN DALAM  
BAHASA INDONESIA

## Pendahuluan

Penyakit paru obstruktif kronik (PPOK) merupakan penyakit yang ditandai dengan penyumbatan aliran udara yang bersifat *irreversible* dan memburuk seiring waktu disertai dengan peradangan saluran pernapasan yang berlebihan. Seperti yang dijelaskan pada bab pengantar (**Bab 1**), keseimbangan antara protein bone morfogenetik protein 4 (BMP4) dan inhibitor alaminya, Follistatin-like 1 (Fstl1) sangat penting dalam pertumbuhan paru-paru embrio normal<sup>1,2</sup> dan dalam menjalankan fungsi biologis normal pada paru-paru dewasa.<sup>3-5</sup> Beberapa penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa Fstl1 berfungsi sebagai regulator sistem imun pada berbagai penyakit inflamasi.<sup>6-8</sup> Namun, fungsi dari Fstl1 dalam perkembangan paru-paru setelah kelahiran dan paru-paru penderita PPOK belum pernah diteliti sebelumnya. Baru-baru ini, beberapa hasil penelitian menunjukkan fungsi penting dari Fstl1 dalam perkembangan fibrosis paru-paru dan alergi asma.<sup>9-13</sup> Penelitian yang dipaparkan dalam tesis ini menunjukkan bahwa Fstl1 diperlukan untuk perkembangan pembuluh paru-paru setelah kelahiran pada hewan model mencit (**Bab 2**). Selain itu, penelitian ini juga menunjukkan peningkatan ekspresi protein Fstl1 pada sel epitel saluran pernapasan pasien penderita PPOK (**Bab 3**). Implikasi dari meningkatnya ekspresi protein Fstl1 pada sel epitel saluran pernapasan juga didiskusikan pada tesis ini. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa Fstl1 yang dihasilkan oleh sel-sel epitel saluran pernapasan berperan sebagai mediator peradangan pada paru-paru (**Bab 5**). Lebih lanjut, hasil penelitian ini juga menunjukkan bahwa BMP4 mengatur diferensiasi sel epitel saluran pernapasan menjadi sel klub varian (**Bab 7**).

### 1. Fungsi Fstl1 dalam perkembangan paru-paru

Perkembangan saluran pernapasan dan sistem pembuluh paru-paru yang fungsional diatur secara ketat oleh berbagai jalur pensinyalan molekuler dalam sel. Pensinyalan molekuler oleh BMP sangat penting dalam proses pertumbuhan dan perkembangan paru-paru, dengan mengatur proliferasi dan migrasi sel-sel otot polos and sel-sel endotel pembuluh,<sup>14-18</sup> serta dalam proses percabangan saluran pernapasan dan pembuluh paru-paru.<sup>19</sup> Salah satu penyakit genetik pembuluh darah yang disebabkan pensinyalan molekuler BMP yang tidak terkoordinasi baik adalah hipertensi arteri pulmonari (PAH).<sup>20-28</sup> Sejalan dengan peran utama pensinyalan molekuler BMP, mencit yang tidak mengekspresikan gen Fstl1 (*Fstl1-knockout* [KO]) mempunyai ukuran paru-paru yang lebih kecil dan memiliki alveolar septa yang lebih tebal dibandingkan mencit *wildtype*. Mencit *Fstl1-KO* juga menderita sesak napas dan meninggal sesaat setelah lahir.<sup>1,2</sup> Penelitian ini menunjukkan bahwa Fstl1 berfungsi untuk morfogenesis dan alveolarisasi paru-paru selama perkembangan embrio. Hasil penelitian yang dipaparkan pada tesis ini menunjukkan bahwa mencit dengan delesi gen Fstl1 spesifik pada sel-sel endotelium (*Fstl1-eKO*) juga menderita sesak napas dan hanya bertahan hidup selama 21 hari setelah dilahirkan (**Bab 2**). Kematian setelah kelahiran pada mencit *Fstl1-eKO* menunjukkan fungsi penting dari Fstl1 pada sel-sel endotelium dalam perkembangan

pembuluh paru-paru setelah kelahiran. Pada mencit, hari ke-5 hingga ke-30 setelah kelahiran adalah tahap yang penting untuk pembentukan, perkembangan, dan maturasi alveoli serta pembuluh darah paru-paru.<sup>19,29</sup> Pembentukan dan percabangan jaringan saluran pernapasan dan pembuluh darah harus terkoordinasi dengan baik sehingga paparan darah terhadap oksigen optimal.<sup>19</sup> Pembentukan jaringan pembuluh kecil paru-paru pada mencit *Fst/1-eKO* mungkin terganggu sehingga menyebabkan gangguan pernapasan (**Bab 2**).

Meskipun perubahan struktur pembuluh besar arteri otot dan elastis pada mencit *Fst/1-eKO* minimal, persentase pembuluh kecil paru-paru yang positif mengekspresikan protein aktin meningkat pada hari ke-21 setelah kelahiran (**Bab 2**). Selain itu, output darah dari ventrikel kanan (*right ventricular output*) menurun pada mencit *Fst/1-eKO* pada hari ke-21 setelah kelahiran (**Bab 2**). Molekuler analisis pada mencit *Fst/1-eKO* menunjukkan bahwa Smad1/5/8 terfosforilasi - indikator aktifnya pensinyalan molekuler BMP - dan ekspresi protein-protein yang diatur oleh BMP (Jagged1, endoglin, dan endothelin-1) meningkat pada hari ke-7 setelah kelahiran (**Bab 2**).

Regulasi vasokonstriksi yang dinamis diatur oleh perubahan molekuler, termasuk peningkatan endothelin-1<sup>30,31</sup> dan/atau perubahan morfologi pada jaringan otot polos, termasuk meningkatnya proliferasi sel otot polos pembuluh darah dan jumlah ekspresi protein aktin pada pembuluh paru-paru.<sup>32,33</sup> Pada mencit *wildtype* transisi regulasi vasokonstriksi dari molekuler ke perubahan morfologi dapat diobservasi (**Bab 2**). Peningkatan ekspresi protein endothelin-1 terjadi secara bersamaan dengan menurunnya persentase pembuluh kecil paru-paru yang aktif pada hari ke-14 dibandingkan pada hari ke-7 setelah kelahiran. Transisi ini normal dan tidak mematikan (**Bab 2**). Namun pada mencit *Fst/1-eKO*, ekspresi protein endothelin-1 sudah tinggi pada hari ke-7 dan tetap tinggi pada hari ke-21 setelah kelahiran, sedangkan persentase pembuluh kecil paru-paru yang positif aktin tidak menurun pada hari ke-21 setelah kelahiran (**Bab 2**). Kombinasi ekspresi endothelin-1 yang tinggi dan persentase pembuluh kecil paru-paru yang positif aktin yang tinggi menyebabkan peningkatan resistensi pembuluh darah paru-paru dan menyebabkan vasokonstriksi (**Bab 2**). Namun, berdasarkan rasio *pulmonary acceleration time* terhadap *ejection time* (PAT/ET), tidak ada perbedaan yang signifikan pada resistensi pembuluh paru-paru pada mencit *Fst/1-eKO* dibandingkan dengan mencit kontrol baik pada hari ke-7 maupun ke-21 setelah kelahiran (**Bab 2**). Resistensi pembuluh paru-paru yang diukur pada katup arteri besar pulmonalis tidak menunjukkan adanya stenosis pulmonari. Observasi ini mencerminkan tahap awal dari disfungsi pembuluh paru-paru pada mencit *Fst/1-eKO*. Hal yang sama juga biasa diamati pada pasien penderita PAH, di mana perubahan fisiologi dan struktur diawali oleh perubahan pensinyalan molekuler BMP yang diikuti oleh disfungsi dan perubahan struktur pembuluh paru-paru pada stadium lanjut.<sup>34</sup> Kemungkinan besar peningkatan resistensi pembuluh paru-paru terjadi pada pembuluh kecil, karena resistensi menjadi fungsi  $1/r^4$  (menurut hukum Hagen-Poiseuille), di mana “r” adalah diameter lumen.<sup>35</sup>

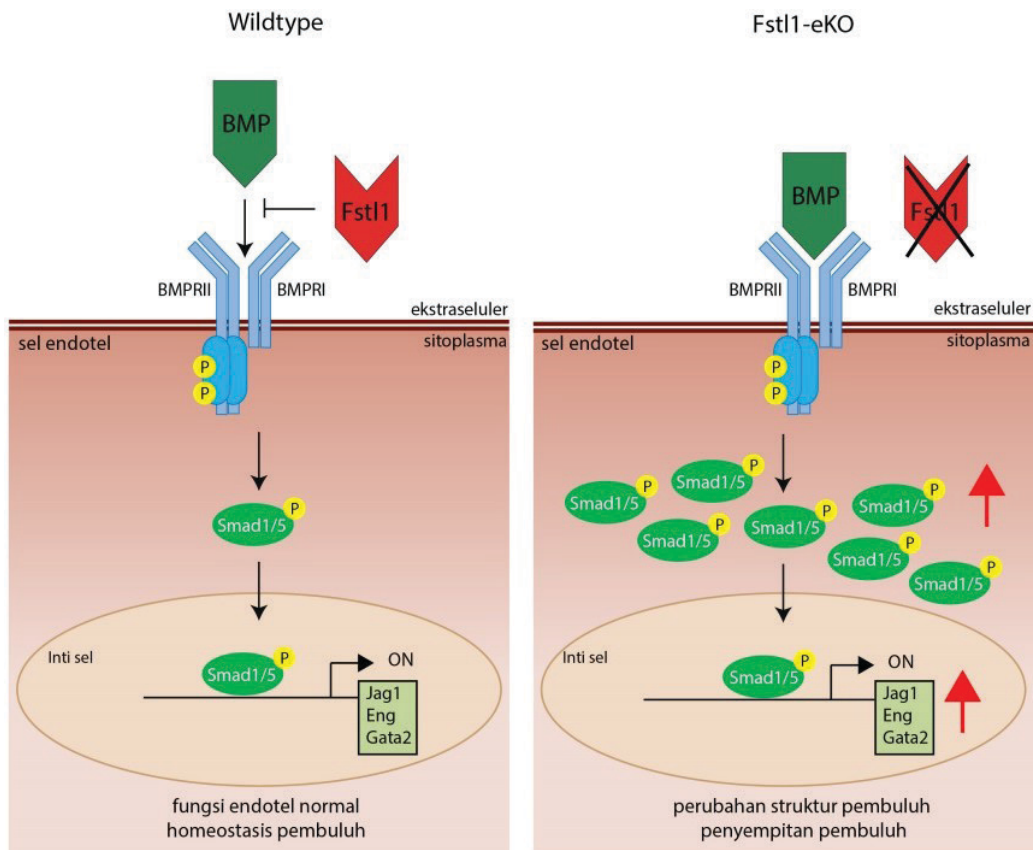
Pada mencit *Fst/1-eKO*, peningkatan kadar endothelin-1 secara transien pada hari ke-7 setelah kelahiran dapat meningkatkan resistensi pembuluh paru-paru. Karena arteri pulmonalis terhubung ke jantung, peningkatan resistensi pembuluh pulmonalis

ini menyebabkan penurunan output dari ventrikel kanan ke paru-paru pada hari ke-21 setelah kelahiran (**Bab 2**). Akibatnya, perubahan morfologi terjadi pada jantung dan paru-paru pada mencit *Fstl1*-eKO pada hari ke-21 setelah kelahiran, seperti hipertrofi ventrikel kanan dan perubahan struktur pembuluh kecil paru-paru (**Bab 2**). Perubahan yang progresif dan ireversibel pada struktur kardiopulmoner pada mencit *Fstl1*-eKO dapat menyebabkan gangguan pernapasan di mana pembuluh kecil paru-paru tidak mampu membawa darah ke paru-paru secara memadai. Hal ini dapat menyebabkan kurangnya pengiriman oksigen ke otak dan akhirnya kematian. Oleh karena itu, penelitian selanjutnya diperlukan untuk memeriksa kadar oksigen dan karbon dioksida dalam darah selain menentukan radius dan kandungan aktin pada pembuluh kecil paru-paru. Secara keseluruhan, perubahan molekuler pada mencit *Fstl1*-eKO bersifat sementara dan dimulai sejak dini dalam perkembangan paru-paru setelah kelahiran, sedangkan fungsi fisiologi dan konsekuensi morfologi terjadi pada tahap selanjutnya. Disregulasi pensinyalan molekuler BMP saja mungkin tidak memadai untuk menyebabkan perubahan struktur dan fungsi pembuluh paru-paru besar pada tahap awal perkembangan, namun dapat diobservasi pada tahap perkembangan paru-paru selanjutnya. Adapula kemungkinan bahwa perubahan molekuler dan morfologi di paru-paru merupakan konsekuensi sekunder dari disfungsi jantung kanan karena penebalan dinding ventrikel kanan. Ventrikel kanan yang menebal dapat menyebabkan penurunan output dari ventrikel kanan yang kemudian menyebabkan hipoksia paru-paru. Sebagai konsekuensinya, persentase pembuluh kecil paru-paru yang positif aktin tidak menurun sementara ekspresi endothelin-1 meningkat di paru-paru pada hari ke-21 setelah kelahiran untuk mendorong aliran darah melalui kapiler paru-paru. Penelitian selanjutnya diperlukan untuk mempelajari struktur dan fungsi kardiovaskular pada mencit *Fstl1*-eKO untuk mengkonfirmasi penyebab utama kematian mencit *Fstl1*-eKO. Fungsi *Fstl1* pada endotelium dalam mengatur sinyal BMP/Smad pada perkembangan pembuluh paru-paru setelah kelahiran diilustrasikan pada **Gambar 1**.

## **2. Fungsi *Fstl1* dalam inflamasi saluran pernapasan pada COPD**

Salah satu patogenesis PPOK adalah aktivasi sistem kekebalan tubuh yang berlebihan dan perbaikan jaringan yang abnormal sebagai respon terhadap polutan udara, seperti asap rokok, dalam jangka waktu yang panjang. Hal ini menyebabkan perubahan struktur epitelium dan perubahan fisiologis dari saluran pernapasan yang berkontribusi terhadap keterbatasan aliran udara pada saluran pernapasan PPOK.<sup>36,37</sup> Sebagai baris pertama dari lingkungan eksternal, sel epitel saluran pernapasan memproduksi mediator inflamasi untuk berkomunikasi dengan sel mesenkim, termasuk fibroblas paru-paru dan sel otot polos saluran pernapasan. Fungsi *Fstl1* dalam komunikasi antar sel telah dilaporkan sebelumnya.<sup>6,9</sup> Hasil penelitian ini mengindikasikan fungsi *Fstl1* dalam mengatur sekresi sitokin inflamasi dalam beberapa penyakit inflamasi.<sup>6,7,38</sup> Namun, keterlibatan *Fstl1* dalam patogenesis PPOK belum pernah diteliti sebelumnya.

Penelitian ini menunjukkan bahwa ekspresi protein *Fstl1* meningkat secara signifikan pada paru-paru perokok yang tidak menderita PPOK dan pada pasien PPOK stadium II dan IV dibandingkan dengan pasien yang tidak menderita PPOK (**Bab 3**).



**Gambar 1. Fungsi Follistatin-like 1 dalam memodulasi pensinyalan molekuler BMP/Smad selama perkembangan pembuluh paru-paru setelah melahirkan.** Pada mencit kontrol, BMP menginduksi fosforilasi protein Smad1/5 dan gen targetnya untuk mempertahankan fungsi normal dan homeostasis pembuluh paru-paru. Delesi Fstl1 dari endotelium pada mencit *Fstl1-eKO* menyebabkan aktivasi yang berlebihan dari protein Smad1/5 dan gen targetnya, termasuk Endoglin, Jag1, Gata2. Peningkatan ekspresi Gata2 meningkatkan ekspresi vasokonstriktor endotelin-1 yang dapat menyebabkan perubahan struktur pembuluh paru-paru dan

Analisis lebih lanjut menunjukkan bahwa protein Fstl1 lebih tinggi ekspresinya pada sel epitel saluran pernapasan, endotelium, sel otot polos pembuluh paru-paru, dan sel imun pada jaringan paru-paru pasien PPOK stadium II dan IV (semua pernah menjadi perokok) dibandingkan jaringan paru-paru pasien yang tidak menderita PPOK (**Bab 3**). Observasi ini mengindikasikan bahwa peningkatan ekspresi protein Fstl1 berhubungan dengan perkembangan PPOK. Tesis ini bertujuan untuk mengevaluasi potensi implikasi dari meningkatnya ekspresi protein Fstl1 berkaitan dengan patogenesis PPOK (**Bab 5 dan 7**). Ekspresi protein Fstl1 pada paru-paru perokok dan mantan perokok yang tidak menderita PPOK juga lebih tinggi dibandingkan pasien yang tidak pernah merokok dan tidak menderita PPOK. Hal ini mengindikasikan bahwa adanya efek jangka panjang yang berkaitan dengan pernah merokok pada ekspresi protein Fstl1 di paru-paru (**Bab 3**). Asap rokok menstimulasi produksi mediator inflamasi yang berkontribusi dalam perekrutan sel-sel imun ke paru-paru, dimana efek asap rokok tersebut tetap ada

setelah berhenti merokok. Fstl1 adalah protein yang diregulasi oleh TGF- $\beta$ 1 dan asap rokok menyebabkan ekspresi protein TGF- $\beta$ 1 meningkat pada sel epitel bronkus.<sup>39</sup> Hal tersebut menunjukkan bahwa TGF- $\beta$ 1 dapat memediasi peningkatan ekspresi protein Fstl1 sebagai respons terhadap asap rokok.

Sel epitel bronkus mengekspresikan dan mensekresikan protein Fstl1 yang paling banyak dibandingkan dengan sel mesenkim paru-paru, seperti fibroblas paru-paru dan sel otot polos saluran pernapasan (**Bab 5**). Sama halnya dengan sel-sel epitel saluran pernapasan pada jaringan paru-paru pasien non-PPOK juga mengekspresikan protein Fstl1 paling banyak (**Bab 3**). Mengingat bahwa Fstl1 adalah inhibitor alami dari BMP4 di paru-paru,<sup>1,2</sup> tingkat fosforilasi protein Smad1/5 lebih rendah pada paru-paru perokok, mantan perokok non-PPOK, dan pada pasien PPOK stadium II dan IV dibandingkan dengan pasien yang tidak pernah merokok dan tidak menderita PPOK (**Bab 3**). Rendahnya tingkat fosforilasi protein Smad1/5 kemungkinan disebabkan oleh peningkatan ekspresi protein Fstl1 di paru-paru (**Bab 3**). BMP4 pada umumnya diekspresikan oleh sel mesenkim, seperti fibroblas paru-paru dan sel otot polos saluran pernapasan sedangkan sel epitel bronkus mengekspresikan dan melepaskan protein BMP4 dengan konsentrasi yang rendah. Ekspresi protein BMP4 pada *distal bud* paru-paru yang sedang berkembang pada tahap pseudoglandular (E11-E16.5), mengkoordinasikan aksis proksimal-distal endoderm dengan mengatur diferensiasi sel epitel.<sup>40</sup> Perbedaan sumber seluler ligan dan inhibitornya pada paru-paru mengindikasikan adanya komunikasi antara sel epitel dan sel mesenkim dalam mengatur fungsi biologis, termasuk regulasi sitokin inflamasi di paru-paru. Tesis ini menganalisis fungsi dari protein Fstl1 dalam inflamasi saluran pernapasan pada individu yang sehat dan fungsinya dalam perkembangan PPOK (**Bab 5**).

Ekspresi protein Fstl1 yang berlebihan pada sel epitel bronkus meningkatkan produksi protein IL-6 dan GM-CSF, mengindikasikan fungsi Fstl1 sebagai regulator sitokin inflamasi (**Bab 5**). Medium yang mengandung Fstl1 (Fstl1 CM) yang berasal dari sel epitel yang mengekspresikan protein Fstl1 secara berlebihan menyebabkan meningkatnya produksi protein IL-6 dan IL-8 dari sel mesenkim paru-paru. Kandidat mediator yang disekresikan oleh sel epitel yang menyebabkan meningkatnya produksi protein IL-6 and IL-8 dari fibroblas paru-paru adalah IL-6, IL-8, GM-CSF dan RANTES. Penelitian ini secara keseluruhan menunjukkan bahwa Fstl1 menginduksi transkripsi dan produksi sitokin inflamasi, seperti GM-CSF dan IL-6, dari sel epitel bronkus, yang kemudian dapat menginduksi produksi IL-6 dan IL-8 dari sel mesenkim paru-paru (**Bab 5**). Fstl1 adalah mediator inflamasi yang mengkoordinasi komunikasi sel epitel dan sel mesenkim dalam mengatur produksi sitokin inflamasi. Oleh karena itu, Fstl1 dapat berperan dalam merekrut sel imun ke paru-paru. Sejalan dengan itu, beberapa penelitian sebelumnya menunjukkan keterlibatan Fstl1 dalam proses patologis penyakit pernapasan, termasuk fibrosis paru-paru dan asma.<sup>9,11-13</sup> Tesis ini mengindikasikan bahwa protein Fstl1 dapat dijadikan target molekuler yang potensial untuk menghambat inflamasi pada saluran pernapasan pada paru-paru PPOK.



### 3. Implikasi dari protein Fstl1 pada sel goblet dan sel basal pada PPOK: Fungsi dari BMP4 pada diferensiasi sel epitel saluran pernapasan dewasa

Pensinyalan molekuler BMP sangat penting dalam mengatur proksimal-distal *axis* saluran pernapasan dalam perkembangan paru-paru embrio dan bayi. Pada paru-paru dewasa, aktivasi pensinyalan molekuler BMP diperlukan untuk regenerasi jaringan epitel paru-paru.<sup>41–46</sup> BMP4 adalah faktor yang disekresikan oleh jaringan mesenkim yang mampu menentukan nasib sel epitel selama perkembangan paru-paru.<sup>40</sup> Selain itu, BMP4 diperlukan untuk diferensiasi sel epitel saluran pernapasan dalam kultur *in vitro* air-liquid interface (ALI).<sup>47</sup>

Sel epitel saluran pernapasan berfungsi sebagai pelindung pertama dari lingkungan luar. Lapisan sel epitel saluran pernapasan pada orang dewasa terdiri dari sel goblet, sel bersilia, sel basal dan sel klub (sebelumnya dikenal sebagai sel clara).<sup>48</sup> Sel goblet yang mensekresikan mukus sebagian besar berada pada bagian proksimal dari saluran pernapasan, begitu pula sel basal, sel klub, dan sel bersilia.<sup>49,50</sup> Jumlah sel klub sekretori, sel bersilia, dan sel neuroendokrin berlimpah pada bronkiolus. Alveoli pernapasan dilapisi dengan lapisan tipis sel alveolar tipe I dan sel alveolar kuboidal tipe II.<sup>51–53</sup>

Asap rokok mengubah komposisi sel epitel saluran pernapasan dan berkontribusi terhadap perubahan struktur sel epitel pada saluran pernapasan pada pasien PPOK.<sup>54</sup> Perubahan struktur jaringan epitel pada saluran pernapasan pada pasien PPOK ditandai dengan metaplasia sel goblet, hiperplasia sel basal, serta hilangnya sel klub yang fungsional. Sel klub varian adalah sel sekretori yang berfungsi sebagai pelindung jaringan paru-paru dengan mengeluarkan uteroglobin, sekretoglobin, dan protein seperti surfaktan yang memiliki fungsi sebagai anti-inflamasi serta penting untuk regenerasi jaringan epitel saluran pernapasan.<sup>55</sup> Sel klub varian memiliki karakteristik seperti sel punca dan mampu melakukan pembaharuan diri dan berdiferensiasi menjadi sel bersilia atau sel goblet.<sup>53,56</sup> Tingkat serum SCGB1A1 yang rendah tidak hanya berkaitan dengan prevalensi dan tingkat keparahan PPOK, tetapi juga dengan penurunan fungsi paru-paru pada pasien PPOK.<sup>57–61</sup>

Pada diferensiasi jaringan epitel saluran pernapasan yang normal, sel basal secara langsung atau tidak langsung (melalui perantara sel klub) berdiferensiasi menjadi sel goblet atau sel bersilia. Tesis ini menunjukkan bahwa BMP4 menstimulasi diferensiasi sel basal ke sel klub varian namun menekan diferensiasi terhadap sel goblet dan sel bersilia pada sel epitel bronkus dewasa (**Bab 7**). Meskipun penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa BMP4 berfungsi dalam diferensiasi jaringan epitel pada paru-paru yang sedang berkembang,<sup>42</sup> hasil penelitian yang dipaparkan dalam tesis ini menunjukkan bahwa BMP4 menstimulasi diferensiasi sel klub varian pada sel epitel saluran pernapasan.

Sejalan dengan penelitian sebelumnya,<sup>59,62,63</sup> tesis ini juga menunjukkan bahwa aktivasi pensinyalan molekuler BMP4 (fosforilasi Smad1/5/8) berkurang sedangkan ekspresi Fstl1 meningkat pada paru-paru pasien PPOK (**Bab 3**). Peningkatan Fstl1 pada sel epitel saluran pernapasan paru-paru PPOK dapat menstimulasi diferensiasi sel epitel menjadi metaplasia sel goblet, hiperplasia sel basal, dan hilangnya sel klub yang merupakan ciri khas dari jaringan epitel saluran pernapasan PPOK. Tesis ini menunjukkan adanya hubungan antara hilangnya sel klub, metaplasia sel goblet, dan hiperplasia sel



basal dengan rendahnya aktivasi pensinyalan molekuler BMP/Smad pada paru-paru pasien PPOK.<sup>62,63</sup>

Studi selanjutnya dengan menggunakan Fstl1 CM atau antibodi penetralisir Fstl1 dan retraksi BMP4 pada sel epitel dewasa setelah 14 hari pada kultur ALI dapat mengungkapkan apakah efek BMP4 *reversible* dan apakah proses diferensiasi sel klub varian dapat dialihkan ke diferensiasi sel bersilia. Studi sebelumnya menunjukkan bahwa inhibitor BMP dapat berfungsi sebagai regulator proliferasi sel basal dengan menghambat fungsi BMP.<sup>64,65</sup> Tingginya protein Fstl1 pada saluran pernapasan pasien PPOK dapat menstimulasi proliferasi sel basal yang berkontribusi pada hiperplasia jaringan epitel saluran pernapasan paru-paru PPOK.

Pada paru-paru yang sedang berkembang, Fstl1 diekspresikan oleh sel goblet<sup>66</sup> sedangkan pada paru-paru orang dewasa yang sehat, Fstl1 diekspresikan sebagian besar oleh sel bersilia (**Bab 3 dan 5**). Sebaliknya, sebagian besar BMP4 diekspresikan oleh sel mesenkim paru-paru, seperti fibroblas paru-paru dan sel otot polos saluran pernapasan. Oleh karena itu, komunikasi sel epitel dan sel mesenkim melalui pensinyalan molekuler BMP penting dalam memodulasi diferensiasi sel bersilia dan sel goblet.

BMP4 menginduksi tingginya ekspresi gen-gen yang dikontrol oleh pensinyalan molekuler Notch selama diferensiasi sel epitel saluran pernapasan dewasa (**Bab 3**). Pensinyalan molekuler Notch menentukan nasib sel epitel di saluran pernapasan. Oleh karena itu, memahami interaksi antara pensinyalan molekuler BMP dan Notch sangat penting untuk memperbaiki regenerasi jaringan epitel saluran pernapasan yang terganggu pada pasien PPOK. Jumlah komponen pensinyalan molekuler Notch, seperti Hey1 dan Hey2 lebih rendah tingkatnya pada pasien penderita PPOK dibandingkan pasien non-PPOK.<sup>59</sup>

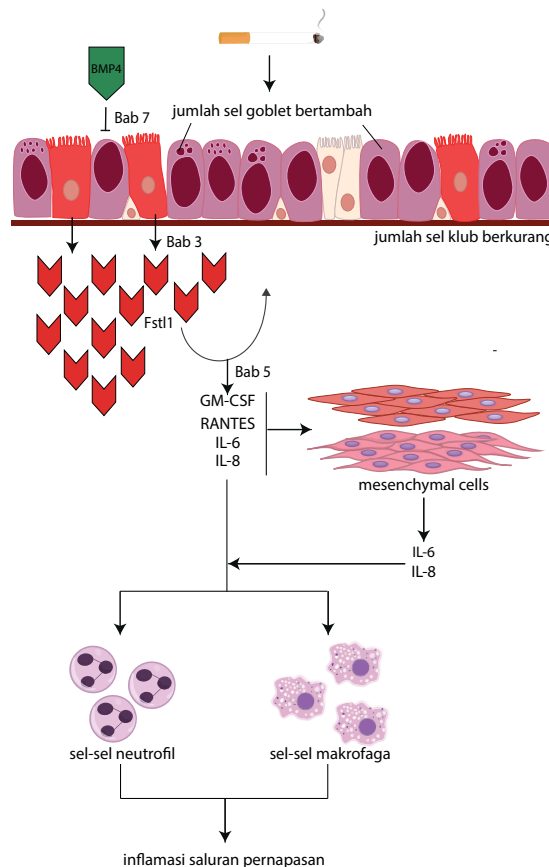
Interaksi antara pensinyalan molekuler BMP dan Notch juga diamati selama perkembangan paru-paru setelah kelahiran pada hewan model mencit. Delesi Fstl1 pada sel endotel mencit *Fstl1-eKO* berkaitan dengan peningkatan Jagged1 pada perkembangan paru-paru setelah kelahiran (**Bab 2**). Selain itu, Hey1 dan Hey3, meningkat di sel epitel bronkus manusia.

Kesimpulannya, tesis ini menunjukkan bahwa BMP4 menghambat diferensiasi sel goblet sementara menstimulasi diferensiasi sel klub varian pada sel epitel saluran pernapasan dewasa. Mengembalikan keseimbangan antara BMP4 dan inhibitornya di paru-paru pasien PPOK merupakan strategi untuk memperbaiki hilangnya sel klub sementara mengurangi metaplasia sel goblet dan hiperplasia sel basal. **Gambar 2** mengilustrasikan implikasi potensial dari meningkatnya protein Fstl1 pada sel-sel epitel saluran pernapasan penderita COPD.

#### 4. Perspektif masa depan

Data yang dipaparkan dalam tesis ini menunjukkan fungsi dari Fstl1 pada paru-paru yang belum pernah diteliti sebelumnya. Tesis ini menganalisis fungsi dari pensinyalan molekuler BMP/Fstl1 dan mengeksplorasi potensi implikasi dari meningkatnya ekspresi protein Fstl1 pada peradangan saluran pernapasan serta perubahan struktur lapisan epitel pada saluran pernapasan pasien PPOK. PAH adalah komorbiditas yang

umum pada pasien PPOK.<sup>67,68</sup> Studi kami menunjukkan salah satu fungsi dari Fstl1 pada sel endotel pembuluh paru-paru, yaitu mengatur tingkat aktivasi BMP/Smad pada perkembangan paru-paru setelah kelahiran (**Bab 2**). Proliferasi sel otot polos pembuluh paru-paru yang tidak terkontrol dan perubahan struktur aktin menyebabkan vasokonstriksi pada pasien PAH. Studi *ex vivo* dengan menggunakan *precision cut lung slices* dapat mengungkapkan kontribusi fungsional dari Fstl1 endotel pada kontraksi pembuluh dengan membandingkan kontraktilitas pembuluh paru-paru antara mencit *Fstl1-eKO* dengan kontrol. Eksperimen dengan menggunakan sistem ko-kultur sel endotel mikrovaskuler dan sel otot polos pembuluh paru-paru dapat mengungkapkan mekanisme Fstl1 dalam mengatur ekspresi aktin pada sel otot polos pembuluh paru-



**Gambar 2. Implikasi patologi peningkatan protein Fstl1 pada sel epitel saluran pernapasan pada pasien PPOK.** Ekspresi protein Fstl1 meningkat pada sel epitel saluran pernapasan pada pasien PPOK stadium II dan IV. Protein Fstl1 kemungkinan diproduksi pada paru-paru dewasa sebagai mekanisme perbaikan jaringan paru-paru akibat paparan kronis terhadap asap rokok. Fstl1 adalah sitokin inflamasi yang memediasi komunikasi antara sel epitel dan sel mesenkim dalam produksi IL-6 dan IL-8. Oleh karena itu, Fstl1 dapat berkontribusi dalam perekrutan neutrofil dan makrofag ke paru-paru dan menyebabkan inflamasi paru-paru kronis. BMP4 menghambat diferensiasi sel goblet dan menstimulasi diferensiasi sel klub varian pada sel epitel saluran pernapasan. Peningkatan Fstl1 pada sel epitel saluran pernapasan pada paru-paru PPOK dapat menginduksi diferensiasi sel epitel menjadi sel goblet sementara jumlah sel klub berkurang.

paru.

Pada pembuluh paru-paru pasien PPOK, peningkatan ekspresi protein Fstl1 pada sel endotel serta sel otot polos pembuluh paru-paru ditemukan pada pasien penderita PPOK (**Bab 3**). Tesis ini juga menunjukkan bahwa tingkat aktivasi pensinyalan BMP/Smad berkurang pada paru-paru pasien PPOK dibandingkan dengan pasien non-PPOK (**Bab 3**). Aktivasi pensinyalan molekuler BMP juga berkurang pada pasien PAH idiopatik,<sup>69–71</sup> namun kontribusi Fstl1 terhadap berkurangnya aktivasi pensinyalan molekuler BMP belum diteliti. Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa inhibitor BMP lainnya, seperti gremlin, meningkat pada sel endotel dari pasien PAH idiopatik maupun hipoksia.<sup>72</sup>

Studi selanjutnya untuk mengevaluasi hubungan antara ekspresi Fstl1 dan fungsi pembuluh paru-paru pada pasien PPOK dengan komorbiditas PAH akan sangat bermanfaat untuk dilakukan. Tesis ini juga mengeksplorasi implikasi potensial peningkatan Fstl1 pada pasien PPOK, terutama pada sel epitel saluran pernapasan. Fstl1 berperan sebagai pro-inflamasi karena dapat memediasi komunikasi antara sel epitel dan sel mesenkim dalam mengatur produksi sitokin inflamasi (**Bab 4**). Penelitian lebih lanjut diperlukan untuk mengidentifikasi reseptor Fstl1 yang terlibat di sel epitel maupun sel mesenkim saluran pernapasan.

BMP4 menghambat diferensiasi sel goblet sementara menstimulasi diferensiasi sel klub varian (**Bab 5**). Penelitian selanjutnya menggunakan mencit model PPOK diperlukan untuk mengkonfirmasi efek fungsional dari meningkatnya ekspresi protein Fstl1 pada jaringan epitel saluran pernapasan. Di samping itu, perlu dilakukan studi selanjutnya untuk mengevaluasi apakah Fstl1 menghambat pensinyalan molekuler BMP dan apakah Fstl1 berkontribusi langsung terhadap metaplasia sel goblet, hiperplasia sel basal, dan hilangnya sel klub varian. Studi berikutnya menggunakan antibodi penetralisir Fstl1 dan Fstl1 rekombinan protein akan bermanfaat untuk mengevaluasi implikasi dari Fstl1 di paru-paru pasien penderita PPOK.

Kesimpulannya, deregulasi pensinyalan molekuler Fstl1/BMP sebagai respon terhadap kerusakan kronis jaringan epitel saluran pernapasan dan pembuluh paru-paru dapat berkontribusi dalam perkembangan PPOK. Oleh karena itu, pemahaman yang baik mengenai mekanisme regulasi Fstl1/BMP dalam perkembangan paru-paru setelah kelahiran sangat penting untuk mengidentifikasi proses perbaikan jaringan paru-paru yang abnormal.



## References

1. Sylva M, Li VSW, Buffing AAA, et al. The BMP antagonist follistatin-like 1 is required for skeletal and lung organogenesis. *PLoS One*. 2011;6(8):e22616. doi:10.1371/journal.pone.0022616.
2. Geng Y, Dong Y, Yu M, et al. Follistatin-like 1 (Fstl1) is a bone morphogenetic protein (BMP) 4 signaling antagonist in controlling mouse lung development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(17):7058-7063. doi:10.1073/pnas.1007293108.
3. Umezu T, Yamanouchi H, Iida Y, Miura M, Tomooka Y. Follistatin-like-1, a diffusible mesenchymal factor determines the fate of epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(10):4601-4606. doi:10.1073/pnas.0909501107.
4. Hayakawa S, Ohashi K, Shibata R, et al. Cardiac Myocyte-Derived Follistatin-Like 1 Prevents Renal Injury in a Subtotal Nephrectomy Model. *J Am Soc Nephrol JASN*. 2015;26(3):636-646. doi:10.1681/ASN.2014020210.
5. Zhou X, Xiao X, Huang T, et al. Epigenetic inactivation of follistatin-like 1 mediates tumor immune evasion in nasopharyngeal carcinoma. *Oncotarget*. 2016;7(13):16433-16444. doi:10.18632/oncotarget.7654.
6. Miyamae T, Marinov AD, Sowders D, et al. Follistatin-Like Protein-1 Is a Novel Proinflammatory Molecule. *J Immunol*. 2006;177(7):4758-4762. doi:10.4049/jimmunol.177.7.4758.
7. Clutter SD, Wilson DC, Marinov AD, Hirsch R. Follistatin-Like Protein 1 Promotes Arthritis by Up-Regulating IFN- $\gamma$ . *J Immunol*. 2009;182(1):234-239. doi:10.4049/jimmunol.182.1.234.
8. Chaly Y, Marinov AD, Oxburgh L, Bushnell DS, Hirsch R. FSTL1 promotes arthritis in mice by enhancing inflammatory cytokine/chemokine expression. *Arthritis Rheum*. 2012;64(4):1082-1088. doi:10.1002/art.33422.
9. Dong Y, Geng Y, Li L, et al. Blocking follistatin-like 1 attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *J Exp Med*. 2015;212(2):235-252. doi:10.1084/jem.20121878.
10. Liu R, Yang Y, Shen J, et al. Fstl1 is involved in the regulation of radial glial scaffold development. *Mol Brain*. 2015;8:53. doi:10.1186/s13041-015-0144-8.
11. Murphy N, Gaynor KU, Rowan SC, et al. Altered Expression of Bone Morphogenetic Protein Accessory Proteins in Murine and Human Pulmonary Fibrosis. *Am J Pathol*. 2016;186(3):600-615. doi:10.1016/j.ajpath.2015.10.032.
12. Miller M, Beppu A, Rosenthal P, et al. Fstl1 Promotes Asthmatic Airway Remodeling by Inducing Oncostatin M. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2015;195(8):3546-3556. doi:10.4049/jimmunol.1501105.
13. Miller M, Esnault S, Kurten RC, et al. Segmental allergen challenge increases levels of airway follistatin-like 1 in patients with asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2016;138(2):596-599.e4. doi:10.1016/j.jaci.2016.01.019.
14. Gangopahyay A, Oran M, Bauer EM, et al. Bone morphogenetic protein receptor II is a novel mediator of endothelial nitric-oxide synthase activation. *J Biol Chem*. 2011;286(38):33134-33140. doi:10.1074/jbc.M111.274100.
15. Xu J, Zhu D, Sonoda S, et al. Over-expression of BMP4 inhibits experimental choroidal neovascularization by modulating VEGF and MMP-9. *Angiogenesis*. 2012;15(2):213-227. doi:10.1007/s10456-012-9254-4.
16. Moreno-Miralles I, Ren R, Moser M, Hartnett ME, Patterson C. Bone morphogenetic protein endothelial cell precursor-derived regulator regulates retinal angiogenesis in vivo in a mouse model of oxygen-induced retinopathy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011;31(10):2216-2222. doi:10.1161/ATVBAHA.111.230235.
17. Helbing T, Rothweiler R, Ketterer E, et al. BMP activity controlled by BMPER regulates the proinflammatory phenotype of endothelium. *Blood*. 2011;118(18):5040-5049. doi:10.1182/blood-2011-03-339762.
18. Suzuki Y, Ohga N, Morishita Y, Hida K, Miyazono K, Watabe T. BMP-9 induces proliferation of multiple types of endothelial cells in vitro and in vivo. *J Cell Sci*. 2010;123(Pt 10):1684-1692. doi:10.1242/jcs.061556.
19. Kool H, Mous D, Tibboel D, de Klein A, Rottier RJ. Pulmonary vascular development goes awry in congenital lung abnormalities. *Birth Defects Res Part C Embryo Today Rev*. 2014;102(4):343-358. doi:10.1002/bdrc.21085.
20. International PPH Consortium, Lane KB, Machado RD, et al. Heterozygous germline mutations in BMPR2, encoding a TGF-beta receptor, cause familial primary pulmonary hypertension. *Nat Genet*.

- 2000;26(1):81-84. doi:10.1038/79226.
21. Machado RD, Aldred MA, James V, et al. Mutations of the TGF-beta type II receptor BMPR2 in pulmonary arterial hypertension. *Hum Mutat.* 2006;27(2):121-132. doi:10.1002/humu.20285.
22. Harrison RE, Flanagan JA, Sankelo M, et al. Molecular and functional analysis identifies ALK-1 as the predominant cause of pulmonary hypertension related to hereditary haemorrhagic telangiectasia. *J Med Genet.* 2003;40(12):865-871.
23. Fujiwara M, Yagi H, Matsuoka R, et al. Implications of mutations of activin receptor-like kinase 1 gene (ALK1) in addition to bone morphogenetic protein receptor II gene (BMPR2) in children with pulmonary arterial hypertension. *Circ J Off J Jpn Circ Soc.* 2008;72(1):127-133.
24. Johnson DW, Berg JN, Baldwin MA, et al. Mutations in the activin receptor-like kinase 1 gene in hereditary haemorrhagic telangiectasia type 2. *Nat Genet.* 1996;13(2):189-195. doi:10.1038/ng0696-189.
25. McAllister KA, Grogg KM, Johnson DW, et al. Endoglin, a TGF-beta binding protein of endothelial cells, is the gene for hereditary haemorrhagic telangiectasia type 1. *Nat Genet.* 1994;8(4):345-351. doi:10.1038/ng1294-345.
26. Pi X, Schmitt CE, Xie L, et al. LRP1-dependent endocytic mechanism governs the signaling output of the bmp system in endothelial cells and in angiogenesis. *Circ Res.* 2012;111(5):564-574. doi:10.1161/CIRCRESAHA.112.274597.
27. Yao Y, Jumabay M, Wang A, Boström KI. Matrix Gla protein deficiency causes arteriovenous malformations in mice. *J Clin Invest.* 2011;121(8):2993-3004. doi:10.1172/JCI57567.
28. Yao Y, Yao J, Radparvar M, et al. Reducing Jagged 1 and 2 levels prevents cerebral arteriovenous malformations in matrix Gla protein deficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(47):19071-19076. doi:10.1073/pnas.1310905110.
29. Jain RK. Molecular regulation of vessel maturation. *Nat Med.* 2003;9(6):685-693. doi:10.1038/nm0603-685.
30. Schiffrin EL. Endothelin and endothelin antagonists in hypertension. *J Hypertens.* 1998;16(12 Pt 2):1891-1895.
31. Lee SH, Channick RN. Endothelin antagonism in pulmonary arterial hypertension. *Semin Respir Crit Care Med.* 2005;26(4):402-408. doi:10.1055/s-2005-916155.
32. Brozovich FV, Nicholson CJ, Degen CV, Gao YZ, Aggarwal M, Morgan KG. Mechanisms of Vascular Smooth Muscle Contraction and the Basis for Pharmacologic Treatment of Smooth Muscle Disorders. *Pharmacol Rev.* 2016;68(2):476-532. doi:10.1124/pr.115.010652.
33. Wilson JL, Yu J, Taylor L, Polgar P. Hyperplastic Growth of Pulmonary Artery Smooth Muscle Cells from Subjects with Pulmonary Arterial Hypertension Is Activated through JNK and p38 MAPK. *PLoS ONE.* 2015;10(4). doi:10.1371/journal.pone.0123662.
34. Noordegraaf AV, Galiè N. The role of the right ventricle in pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir Rev.* 2011;20(122):243-253. doi:10.1183/09059180.00006511.
35. NAEIJE R, CHESLER N. PULMONARY CIRCULATION AT EXERCISE. *Compr Physiol.* 2012;2(1):711-741. doi:10.1002/cphy.c100091.
36. Knight D. Epithelium–fibroblast interactions in response to airway inflammation. *Immunol Cell Biol.* 2001;79(2):160-164. doi:10.1046/j.1440-1711.2001.00988.x.
37. Osei ET, Brandsma C-A, Noordhoek JA, Timens W, Postma D, Heijink I. Crosstalk between epithelium and fibroblasts; implications for COPD. *Eur Respir J.* 2014;44(Suppl 58):P3899.
38. Ouchi N, Oshima Y, Ohashi K, et al. Follistatin-like 1, a secreted muscle protein, promotes endothelial cell function and revascularization in ischemic tissue through a nitric-oxide synthase-dependent mechanism. *J Biol Chem.* 2008;283(47):32802-32811. doi:10.1074/jbc.M803440200.
39. Shibamura M, Mashimo J, Mita A, Kuroki T, Nose K. Cloning from a mouse osteoblastic cell line of a set of transforming-growth-factor-beta 1-regulated genes, one of which seems to encode a follistatin-related polypeptide. *Eur J Biochem FEBS.* 1993;217(1):13-19.
40. Morrissey EE, Hogan BLM. Preparing for the first breath: genetic and cellular mechanisms in lung development. *Dev Cell.* 2010;18(1):8-23. doi:10.1016/j.devcel.2009.12.010.
41. Bellusci S, Henderson R, Winnier G, Oikawa T, Hogan BL. Evidence from normal expression and targeted misexpression that bone morphogenetic protein (Bmp-4) plays a role in mouse embryonic lung morphogenesis. *Dev Camb Engl.* 1996;122(6):1693-1702.
42. Weaver M, Yingling JM, Dunn NR, Bellusci S, Hogan BL. Bmp signaling regulates proximal-distal

- differentiation of endoderm in mouse lung development. *Dev Camb Engl*. 1999;126(18):4005-4015.
43. Sountoulidis A, Stavropoulos A, Giaglis S, et al. Activation of the canonical bone morphogenetic protein (BMP) pathway during lung morphogenesis and adult lung tissue repair. *PLoS One*. 2012;7(8):e41460. doi:10.1371/journal.pone.0041460.
44. Ninomiya N, Michiue T, Asashima M, Kurisaki A. BMP signaling regulates the differentiation of mouse embryonic stem cells into lung epithelial cell lineages. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 2013;49(3):230-237. doi:10.1007/s11626-013-9589-1.
45. Huang SXL, Islam MN, O'Neill J, et al. Highly efficient generation of airway and lung epithelial cells from human pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol*. 2014;32(1):84-91. doi:10.1038/nbt.2754.
46. Huang SXL, Green MD, de Carvalho AT, et al. The in vitro generation of lung and airway progenitor cells from human pluripotent stem cells. *Nat Protoc*. 2015;10(3):413-425. doi:10.1038/nprot.2015.023.
47. Ross AJ, Dailey LA, Brighton LE, Devlin RB. Transcriptional profiling of mucociliary differentiation in human airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2007;37(2):169-185. doi:10.1165/rcmb.2006-0466OC.
48. Fahy JV, Dickey BF. Airway Mucus Function and Dysfunction. *N Engl J Med*. 2010;363(23):2233-2247. doi:10.1056/NEJMr0910061.
49. Hong KU, Reynolds SD, Watkins S, Fuchs E, Stripp BR. Basal cells are a multipotent progenitor capable of renewing the bronchial epithelium. *Am J Pathol*. 2004;164(2):577-588. doi:10.1016/S0002-9440(10)63147-1.
50. Rock JR, Onaitis MW, Rawlins EL, et al. Basal cells as stem cells of the mouse trachea and human airway epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(31):12771-12775. doi:10.1073/pnas.0906850106.
51. Kimura J, Deutsch GH. Key mechanisms of early lung development. *Pediatr Dev Pathol Off J Soc Pediatr Pathol Paediatr Pathol Soc*. 2007;10(5):335-347. doi:10.2350/07-06-0290.1.
52. Rawlins EL, Hogan BLM. Epithelial stem cells of the lung: privileged few or opportunities for many? *Dev Camb Engl*. 2006;133(13):2455-2465. doi:10.1242/dev.02407.
53. Kotton DN, Morrissey EE. Lung regeneration: mechanisms, applications and emerging stem cell populations. *Nat Med*. 2014;20(8):822-832. doi:10.1038/nm.3642.
54. Schamberger AC, Staab-Weijnitz CA, Mise-Racek N, Eickelberg O. Cigarette smoke alters primary human bronchial epithelial cell differentiation at the air-liquid interface. *Sci Rep*. 2015;5. doi:10.1038/srep08163.
55. Guha A, Vasconcelos M, Cai Y, et al. Neuroepithelial body microenvironment is a niche for a distinct subset of Clara-like precursors in the developing airways. *Proc Natl Acad Sci*. 2012;109(31):12592-12597. doi:10.1073/pnas.1204710109.
56. Barnes PJ. Club cells, their secretory protein, and COPD. *Chest*. 2015;147(6):1447-1448. doi:10.1378/chest.14-3171.
57. Bernard A, Marchandise FX, Depelchin S, Lauwerys R, Sibille Y. Clara cell protein in serum and bronchoalveolar lavage. *Eur Respir J*. 1992;5(10):1231-1238.
58. Vestbo J, Edwards LD, Scanlon PD, et al. Changes in Forced Expiratory Volume in 1 Second over Time in COPD. *N Engl J Med*. 2011;365(13):1184-1192. doi:10.1056/NEJMoa1105482.
59. Park HY, Churg A, Wright JL, et al. Club cell protein 16 and disease progression in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2013;188(12):1413-1419. doi:10.1164/rccm.201305-0892OC.
60. Lomas DA, Silverman EK, Edwards LD, et al. Evaluation of serum CC-16 as a biomarker for COPD in the ECLIPSE cohort. *Thorax*. 2008;63(12):1058-1063. doi:10.1136/thx.2008.102574.
61. Guerra S, Halonen M, Vasquez MM, et al. The relation of circulating CC16 to lung function growth, decline, and development of COPD across the lifespan. *Lancet Respir Med*. 2015;3(8):613-620. doi:10.1016/S2213-2600(15)00196-4.
62. Myllärniemi M, Lindholm P, Ryyänen MJ, et al. Gremlin-mediated decrease in bone morphogenetic protein signaling promotes pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008;177(3):321-329. doi:10.1164/rccm.200706-945OC.
63. De Langhe E, Cailotto F, De Vooght V, et al. Enhanced endogenous bone morphogenetic protein signaling protects against bleomycin induced pulmonary fibrosis. *Respir Res*. 2015;16:38. doi:10.1186/s12931-015-0202-x.
64. Cibois M, Luxardi G, Chevalier B, et al. BMP signalling controls the construction of vertebrate mucociliary epithelia. *Development*. 2015;142(13):2352-2363. doi:10.1242/dev.118679.



65. Tadokoro T, Gao X, Hong CC, Hotten D, Hogan BLM. BMP signaling and cellular dynamics during regeneration of airway epithelium from basal progenitors. *Dev Camb Engl*. 2016;143(5):764-773. doi:10.1242/dev.126656.
66. Adams D, Larman B, Oxburgh L. Developmental expression of mouse Follistatin-like 1 (Fstl1): Dynamic regulation during organogenesis of the kidney and lung. *Gene Expr Patterns*. 2007;7(4):491-500. doi:10.1016/j.modgep.2006.10.009.
67. Siafakas NM, Antoniou KM, Tzortzaki EG. Role of angiogenesis and vascular remodeling in chronic obstructive pulmonary disease. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2007;2(4):453-462.
68. Hashimoto M, Tanaka H, Abe S. Quantitative analysis of bronchial wall vascularity in the medium and small airways of patients with asthma and COPD. *Chest*. 2005;127(3):965-972. doi:10.1378/chest.127.3.965.
69. Morty RE, Nejman B, Kwapiszewska G, et al. Dysregulated bone morphogenetic protein signaling in monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007;27(5):1072-1078. doi:10.1161/ATVBAHA.107.141200.
70. Takahashi K, Kogaki S, Matsushita T, Nasuno S, Kurotobi S, Ozono K. Hypoxia induces alteration of bone morphogenetic protein receptor signaling in pulmonary artery endothelial cell. *Pediatr Res*. 2007;61(4):392-397. doi:10.1203/pdr.0b013e3180332cba.
71. Long L, Crosby A, Yang X, et al. Altered Bone Morphogenetic Protein and Transforming Growth Factor- $\beta$  Signaling in Rat Models of Pulmonary Hypertension. *Circulation*. 2009;119(4):566-576. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.108.821504.
72. Cahill E, Rowan SC, Sands M, et al. The pathophysiological basis of chronic hypoxic pulmonary hypertension in the mouse: vasoconstrictor and structural mechanisms contribute equally. *Exp Physiol*. 2012;97(6):796-806. doi:10.1113/expphysiol.2012.065474.

